动 物 学 研 究 2009，Dec. 30(6):603-612 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.06603

李氏大足蝗线粒体全基因组序列分析

高 佳, 程春花, 黄 原*

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 采用长距PCR 扩增及保守引物步移法测定并注释了李氏大足蝗(*Aeropus licenti* Chang)的线粒体基因组全序列。结果表明，李氏大足蝗的线粒体基因组全长15597 bp，A+T 含量为74.8%，37个基因位置与飞蝗的一致，基因间隔序列共计17处105 bp，间隔长度从1～21 bp不等；有10对基因间存在58 bp重叠，重叠碱基数在1～17 bp之间。13个蛋白质编码基因中找到4种可能的起始密码子；有12个基因在3'端找到完全的TAA或TAG 终止密码子，只有ND5基因终止密码子为不完整的T。除$tRNA^{Ser}$（AGN）外，其余21个tRNA的二级结构均属典型的三叶草结构。$tRNA^{Ser}$（AGN）的DHU臂缺失，在相应的位置上只形成一个环。预测的lrRNA二级结构总共有6个结构域（结构域III缺失)，47个茎环结构；预测的srRNA的二级结构包含3个结构域，31个茎环结构。A+T 丰富区长度为712 bp。

关键词: 线粒体基因组；rRNA二级结构；李氏大足蝗；槌角蝗科；直翅目

中图分类号: Q969.26; Q969.265.1; Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2009)06-0603-10

Analysis of Complete Mitochondrial Genome Sequence of *Aeropus licenti* Chang

GAO Jia, CHENG Chun-hua, HUANG Yuan*

(*College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an* 710062*, China*)

Abstract: The complete mitochondrial genome sequence of *Aeropus licenti* Chang was determined using long PCR and conserved primer walking approaches. The results showed that the entire mitochondrial genome of *Aeropus licenti* Chang is 15597 bp long with A+T content 74.8%. All 37 genes are conserved in the position observed in that of *Locusta migratoria*. Genes are closely assembled one after the other, leaving a total of 105 bp (excluding the A+T rich region) in intergenic spacers, ranging in size from 1 bp to 21 bp. There are a total of 58 overlapping nucleotides among 10 genes with overlapping range from 1 to 17 bp. Four types of start codons were identified in the 13 protein coding genes (PCGs), in which TAA and TAG were used in 12 PCGs as stop codons, except ND5 (T). Most tRNA genes could form typical secondary structures except $tRNA^{Ser}$ (AGN), which had an absence of the DHU arm. There are six domains, 47 helices and three domains, 31 helices in the secondary structures of lrRNA and srRNA respectively. In addition, there is an A+T rich region with 712 bp in length.

Key words: Mitochondrial genome; rRNA secondary structure; *Aeropus licenti* Chang; Gomphoceridae; Orthoptera

后生动物线粒体基因组（mitochondrial genome, mtDNA）通常是编码37个基因（13个蛋白质基因、22个tRNA基因及2个rRNA基因）和1个控制区（也称A+T丰富区）的细胞器基因组（Wolstenholme, 1992; Shadel & Clayton, 1993）。目前mtDNA被广泛用于系统发育重建、谱系生物地理学、群体结构及动态和基因组水平分子进化等领域的研究(Simon et al, 1994, 2006)。 随着测序技术的飞速发展及基因组研究的不断深入，根据NCBI基因组数据www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/mztax_short.html 的统计，截至2009年4月已测出全线粒体基因的后生动物种类有1 511种， 其中节肢动

收稿日期：2009-05-05；接受日期：2009-10-14
基金项目：国家自然科学基金(30670279，30970346)
*通讯作者(Corresponding author),E-mail: yuanh@snnu.edu.cn
第一作者简介:高佳,女,硕士研究生,研究方向:昆虫分子进化，E-mail: gaojia1110@gmail.com

物有215种。在已测出的节肢动物4大类群中，螯肢动物（Chelicerata）有41种、多足动物（Myriapoda）有8种、甲壳动物（Crustacea）有39种、六足动物（Hexapoda）有127种；而直翅目已测出全线粒体基因组的物种只有10余种。由于测序的类群较少，所选物种的特殊进化模式及建树时的长枝吸引等问题，在推断直翅目系统发育和进化地位时存在困难。而增加这些类群中有关物种的全序列数据将有利于建立比较稳健的系统发育关系。

李氏大足蝗(*Aeropus licenti* Chang)是直翅目蝗总科槌角蝗科(Gomphoceridae)的广布种和常见种，对该物种的研究对于了解槌角蝗科在蝗总科中的系统发育地位有重要价值。本文测定并注释了李氏大足蝗线粒体基因组全序列，并对其编码的大小亚基rRNA的二级结构做了预测和分析。李氏大足蝗线粒体基因组的测定为直翅目昆虫线粒体谱系基因组学提供了新数据。

1 材料和方法

1.1 标本采集及总DNA的提取

李氏大足蝗标本于2007年7月采集于内蒙古根河，保存于100%酒精。直接用酚-氯仿抽提法，从标本的后足股节肌肉提取总DNA，保存于−20℃。

1.2 PCR扩增、克隆及测序

首先，通过两对长距PCR（L-PCR）引物（Shi et al，2008）将李氏大足蝗线粒体基因组扩增为两条相互重叠的片段（片段A和B）（Liu et al，2006），PCR反应循环条件如下：93℃预变性2 min→(92℃ 10 s，48℃ 30 s，68℃ 8 min)×15→(92℃ 10 s，48℃ 30 s，68℃ 8 min +20 s)×15→68℃ 7 min→4℃。

其次，用27对保守引物以片段A和B为模板将整个基因组扩增为500～1500 bp的短片段（Shi et al，2008）。短片段扩增体系总体积为25 μL，包括10×反应缓冲液2.5 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10 μmol/L上、下游引物各1.5～5 μL，5 U/μL TaqDNA聚合酶0.15～0.35 μL和长片段产物（作为DNA模板）1～2 μL，然后加ddH_2O至终体积25 μL。PCR反应程序为：94℃×2 min＋（94℃×30 s＋38～55℃×30 s＋72℃×1 min）×30 cycles＋72℃×7 min＋4℃ forever。

27条PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳检测，切胶纯化后直接测序，对于直接测序结果不好的片段再采用克隆测序（Shi et al，2008）。

1.3 序列拼接、注释及分析

用Standen package（Bonfield et al, 1995; http://standen.sourceforge.net）对所测序列进行拼接。拼接好的基因组序列首先利用tRNAscan-SE Search Server v1.21（Lowe & Eddy, 1997; http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE）共预测出17个tRNA基因，其余的tRNA基因、蛋白质基因、rRNA基因及A+T丰富区的相应位置通过与非洲飞蝗（NC_001712）的相应基因序列比对来确定。确定每个基因的位置及序列后，利用Clustal X（Thompson et al, 1997）及MEGA 4.0（Kumar et al, 2004）等软件对序列信息进行分析。另外，以螽斯*Ruspolia dubia*（Zhou et al, 2007）和蜜蜂*Apis mellifera*（Gillespie et al, 2006）的lrRNA 和srRNA二级结构为基础对李氏大足蝗相应rRNA 的二级结构进行了预测。

2 结果与分析

2.1 基因组结构

李氏大足蝗线粒体基因组序列已提交到GenBank，序列号为：GQ180102。拼接好的李氏大足蝗线粒体基因组全长15597 bp，A+T含量为74.8%，其中包括13个蛋白质基因、22个tRNA基因，2个核糖体RNA基因、还有1个界于$tRNA^{Ile}$和12*S* rRNA之间的非编码区，即AT丰富区。线粒体基因组编码37个基因：N链编码14个基因，包括4个蛋白质基因（ND1、ND4、ND4L、ND5）、8个tRNA 基因（Q、C、Y、F、H、P、V、L-CUN）和2个rRNA基因（16*S* rRNA、12*S* rRNA）；其余的23个基因则由J链编码，其中蛋白质编码基因、tRNA基因和rRNA基因比较保守，而AT丰富区的变化较大。李氏大足蝗线粒体基因组结构如图1所示。

李氏大足蝗线粒体基因组有 17 处基因间隔区域，共105 bp，长度范围在1～21 bp之间，最大的基因间隔出现在$tRNA^{Ser(UCN)}$ 和ND1 这两个基因之间，具体见表1。李氏大足蝗线粒体基因组共有10处重叠，共计58 bp，长度范围在1～17 bp之间，最大的基因重叠出现在$tRNA^{Phe}$和ND5之间。

2.2 碱基组成特点

李氏大足蝗线粒体基因组AT含量为74.8%，有明显的AT偏向性（其中A为42.7%，T为32.1%，C为14.4%，G为10.8%），蛋白编码基因序列的AT含量是75.7%，其中AT含量最高的区域是AT丰富区和N链编码基因的密码子第1位点。

2.3　蛋白质编码基因的密码子使用情况

利用 MEGA4.0 对李氏大足蝗的 13 个蛋白质编码基因的相对同义密码子使用频率（relative synonymous codon usage, RSCU）进行了统计。李氏大足蝗的线粒体基因组中蛋白编码基因的密码子使用都存在着强烈的密码子使用偏向性，其中 NNU 和 NNA 密码子 RSCU 基本都大于 1，第 3 位点为 A 和 U 的密码子使用频率较高，李氏大足蝗的密码子第 3 位点 A+T 含量高达 81.6%，NNU 和 NNA 密码子使用的偏向性与蛋白质编码基因的密码子的第 3 位的 A+T 偏向性表现出正相关性。

2.4　转运RNA（tRNA）基因

通过tRNAScan-SE软件预测以及与飞蝗线粒体基因组序列的比较各确定了李氏大足蝗的22个tRNA基因的位置及二级结构（图2）。除tRNA$^{Ser(AGN)}$外，其余的21个tRNA基因的二级结均属典型的三叶草结构。tRNA$^{Ser(AGN)}$的DHU臂缺失，在相应的位置上只形成一个环。

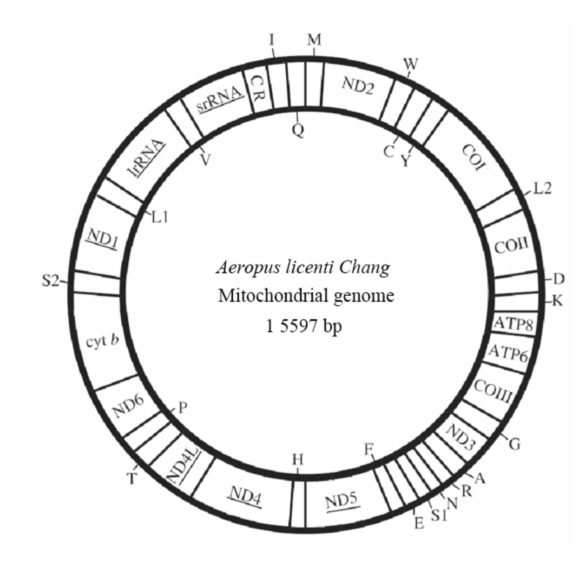


图 1　李氏大足蝗线粒体基因组结构

Fig. 1　The structure of complete mitochondrial genome of *Aeropus licenti* Chang

加下划线“＿”的基因在N链上编码；tRNA基因用氨基酸的单字母表示；L1、L2 和S1、S2分别表示*tRNA*$^{Leu(CUN)}$、*tRNA*$^{Leu(UUR)}$和*tRNA*$^{Ser(AGN)}$、*tRNA*$^{Ser(UCN)}$。Those genes encoded by the N strand are underlined. The tRNA genes are designated by single letter amino acid codes; L1, L2 and S1, S2 denote the *tRNA*$^{Leu(CUN)}$, *tRNA*$^{Leu(UUR)}$ and *tRNA*$^{Ser(AGN)}$, *tRNA*$^{Ser(UCN)}$.

表 1　李氏大足蝗线粒体基因组成

Tab. 1　Mitochondrial gene profile of *Aeropus licenti* Chang

基因/区域 Gene/ Region	位置 Position		长度 Size	起始/终止密码子 Start/ Stop condon		核苷酸间隔 IR/OR$_{b/c}$
tRNA^{Ile}	1	67	67			
tRNA^{Gln}	(71	139)	69			3
tRNA^{Met}	143	211	69			3
ND2	212	1240	1029	ATG	TAA	0
tRNA^{Trp}	1231	1298	68			10
tRNA^{Cys}	(1291	1353)	63			-8
tRNA^{Tyr}	(1366	1433)	68			12
COⅠ	1444	2979	1536	ATTA	TAA	10
tRNA$^{Leu(UUR)}$	(2982	3047)	66			2
COⅡ	3051	3734	684	ATG	TAA	3
tRNA^{Asp}	3733	3797	65			-2
tRNA^{Lys}	3800	3870	71			1
ATP8	3885	4046	162	ATC	TAA	14
ATP6	4040	4717	678	ATG	TAA	-7
COXIII	4722	5513	792	ATG	TAA	4
tRNA^{Gly}	5516	5579	64			2
ND3	5580	5927	348	ATT	TAG	0
tRNA^{Ala}	5926	5990	65			- 2
tRNA^{Arg}	5996	6060	65			5
tRNA^{Asn}	6061	6125	65			0

(续下表)

(接上表)

基因/区域 Gene/ Region	位置 Position		长度 Size	起始/终止密码子 Start/ Stop condon		核苷酸间隔 IR/OR$_{b/c}$
tRNA$^{Ser(AGN)}$	6126	6192	67			0
tRNA^{Glu}	6193	6259	67			0
tRNA^{Phe}	6258	6342	85			-2
ND5	（6325	8041）	1716	ATT	T*	-17
tRNA^{His}	（8057	8126）	70			15
ND4	（8129	9460）	1332	ATG	TAG	2
ND4L	（9454	9750）	297	ATG	TAA	-7
tRNA^{Thr}	9753	9820	68			2
tRNA^{Pro}	（9821	9884）	64			0
ND6	9887	10408	522	ATG	TAA	2
CYTB	10412	11551	1140	ATG	TAA	3
tRNA$^{Ser(UCN)}$	11551	11620	70			1
ND1	（11642	12586）	1014	ATA	TAG	21
tRNA$^{Leu(CUN)}$	（12590	12655）	66			3
l-rRNA(16s)	（12655	13969）	1315			-1
tRNA^{Val}	（13969	14039）	71			-1
s-rRNA(12s)	（14039	14885）	847			-1
D-Loop(CR)	14886	15597	712			0

用括号标注的表示在N链上编码的基因；IR：基因间隔区；cv:OR：基因重叠区。

Brackets denote that the gene is encoded on the N strand; IR= Intergenic region; c: OR=overlap region.

2.5 核糖体RNA（rRNA）基因

李氏大足蝗线粒体基因组的两个rRNA基因（lrRNA和srRNA）分别位于tRNA^{Leu}(L-CUN)、tRNA^{Val} (V)和tRNA^{Val} (V)、D-loop之间（图1）。两个rRNA基因的A+T含量为75.8%，高于整个基因组的平均A+T含量（74.8%），G含量为9.1%，C含量为15%。

以螽斯 (*Ruspolia dubia*)（Zhou et al, 2007）和蜜蜂 (*Apis mellifera*)（Gillespie et al, 2006）的lrRNA和srRNA二级结构为基础对李氏大足蝗的二级结构进行了预测。李氏大足蝗的srRNA和lrRNA二级结构整体与螽斯和蜜蜂相似，只在少数位置存在差异。李氏大足蝗srRNA的二级结构包含3 个结构域，31个茎环结构(图3A)；而lrRNA二级结构总共有6个结构域（结构域III缺失），47个茎环结构（图3B）。

2.6 A+T丰富区（D-loop）

由于AT丰富区存在不同数量的重复单元，所以AT丰富区的长度差异比较大，而线粒体基因组的长度差异也主要是由于长度不等的AT丰富区造成的。前人报道昆虫线粒体AT丰富区的长度范围从70 bp（Zhou et al, 2007）到4061 bp（Monforte et al，1993）。李氏大足蝗线粒体基因组的AT丰富区位于12S rRNA和tRNA^{Ile}之间，全长为712 bp，AT含量为 83.7%，明显高于整个基因组的AT平均水平74.8%。

3 讨论

3.1 四种直翅目昆虫线粒体基因组的结构和基因顺序比较

在 GenBank 中下载已有的直翅目昆虫非洲飞蝗（*Locusta migratoria* ）（Flook et al, 1995）、中华稻蝗（*Oxya chinesis*）（Zhang et al，2008）、疑钩额螽（*Ruspolia dubia*）（Zhou et al, 2007）的全线粒体基因组，并与本论文所研究的李氏大足蝗进行结构和基因顺序的比较。

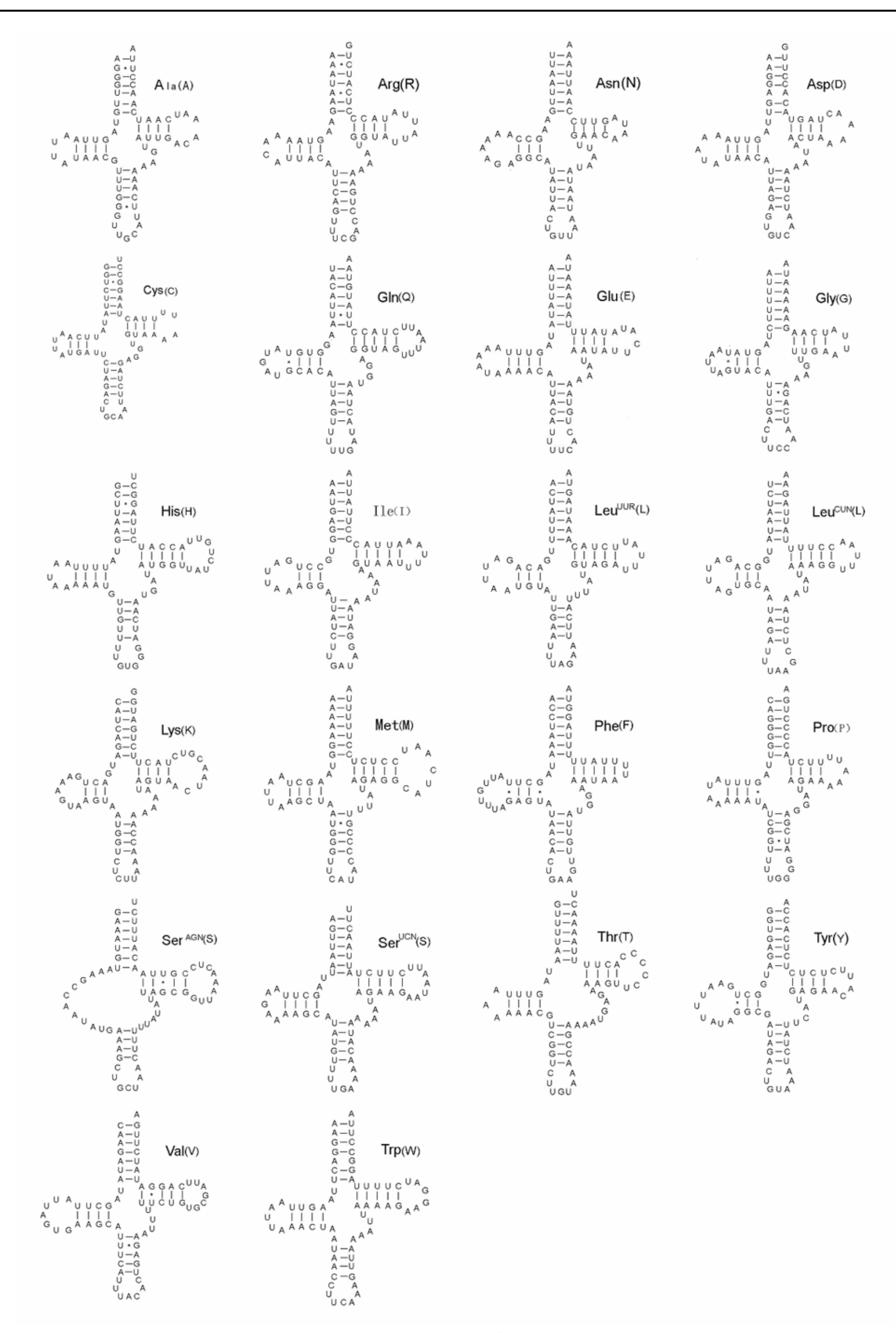


图 2　李氏大足蝗的22种tRNA二级结构

Fig. 2　Potential secondary of the 22 inferred tRNAs in *Aeropus licenti* Chang

tRNA基因用相应的氨基酸缩写命名；直线：标准的AT、CG 配对；*：GU配对。

The tRNAs are labeled with the abbreviations of their corresponding amino acids. Dashes indicating Watson-Crick base pairing and centered asterisks (*) indicating GU base pairing.

李氏大足蝗、非洲飞蝗，中华稻蝗和疑钩额螽的全线粒体基因组长度分别为 15 597、15 722、15 443 和 14 976 bp，均包含 37 个基因和 1 个 A+T 丰富区。线粒体基因组编码 37 个基因： N 链编码 14 个基因，包括 4 个蛋白质基因（ND1、ND4、ND4L、ND5）、8 个 tRNA 基因 [Gln，Cys，Tyr，Phe，His，Pro，Leu（CUN），Val]以及 2 个 rRNA 基因（16*S* rRNA，12*S* rRNA）；其余的 23 个基因则由 J 链编码。

大部分节肢动物线粒体基因组的基因排列顺

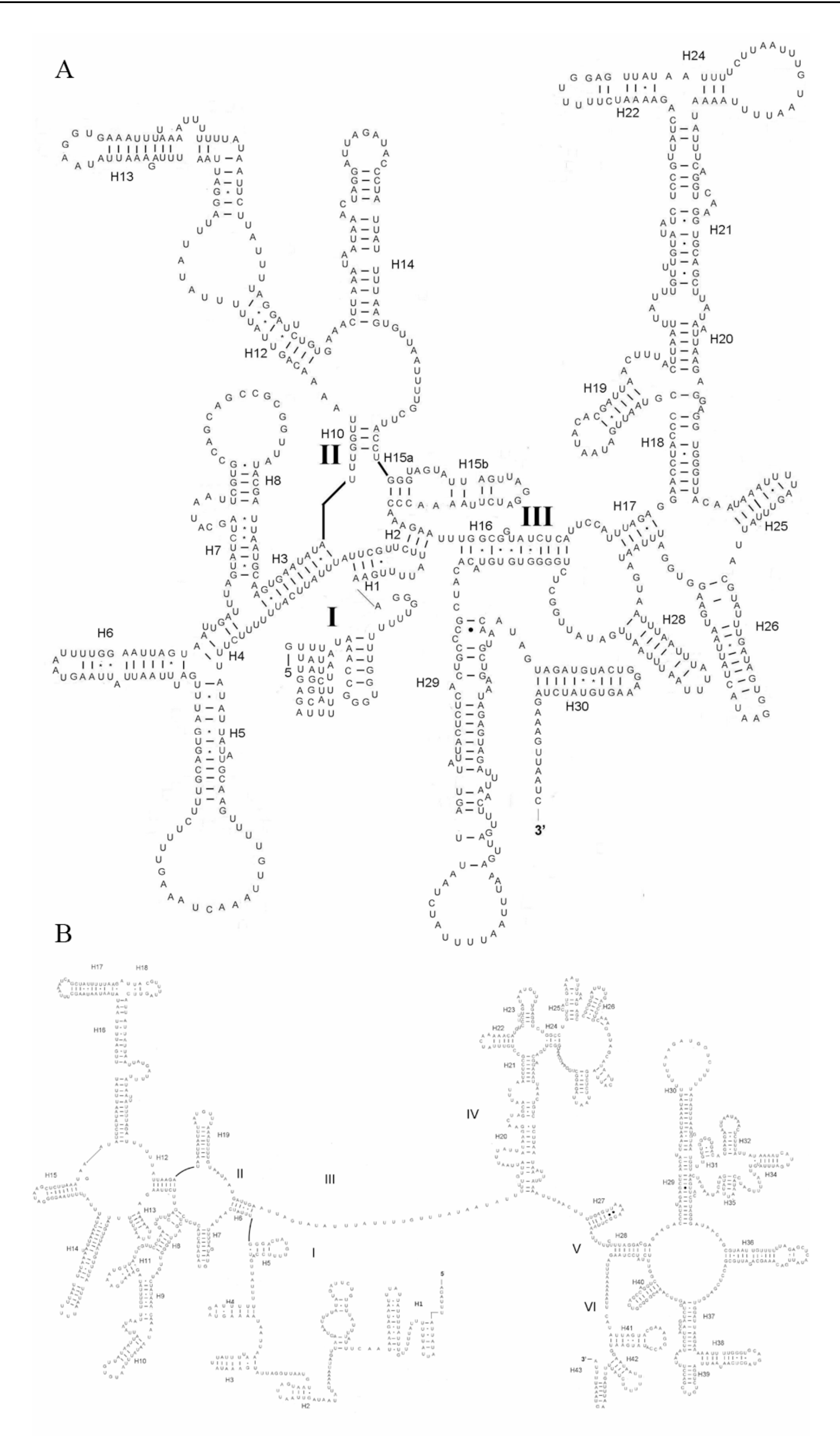


图 3 李氏大足蝗 rRNA（srRNA 和 lrRNA）二级结构预测结果

Fig. 3 The secondary structure of rRNA （srRNA and lrRNA）of *Aeropus licenti* Chang

A：srRNA 二级结构预测结果；B：lrRNA 二级结构预测结果。

A：The secondary structures of srRNA；B：The secondary structures of lrRNA.

序如图 1 所示。在这四种直翅目昆虫中，李氏大足蝗线粒体基因组的 37 个基因顺序和转录方向与非洲飞蝗的完全一致，它们都具有与典型的节肢动物线粒体基因组基因排列顺序不一致的特征——KD转位现象，即tRNA^{Asp}（D）基因排在tRNA^{lys}（K）基因前面，为DK排列，除DK排序有所不同之外，其余基因的排列顺序完全相同。而疑钩额螽线粒体基因组则与典型的节肢动物相同，为KD排列。

3.2　基因组基因间隔和重叠区比较

李氏大足蝗、非洲飞蝗、疑钩额螽和中华稻蝗的全线粒体基因组基因间隔区域分别为17、16、14和17处；总共的间隔序列长度分别为105、101、86和87 bp；最长的间隔序列分别为21、19、22和21 bp；最长基因间隔区所在的位置均为tRNA^{Ser} (UCN)和ND1基因之间。在个别其它直翅目昆虫线粒体基因组中，也可以发现在tRNA^{Ser}(UCN)和ND1基因之间也存在较大的基因间隔(Shi et al，2008)。

李氏大足蝗、非洲飞蝗、疑钩额螽和中华稻蝗的全线粒体基因组基因重叠区域分别为10、10、13和14处；重叠序列总长度分别为58、42、56和65 bp；最长的重叠序列分别为17、10、8和19 bp。在其他昆虫中，总的重叠序列范围在20 bp（*Bombyx mori*）（Yukuhiro et al，2002）到152 bp（*Anopheles quadrimaculatus*）（Mitchell et al，1993）之间。目前发现的最长的基因重叠区为77 bp，存在于螺旋蝇（*Cochliomyia hominivorax*）（Lessinger et al，2000）的tRNA^{Ser}(UCN)和ND1基因之间。

3.3　tRNA基因的二级结构比较

李氏大足蝗、非洲飞蝗、疑钩额螽和中华稻蝗的tRNA基因，除了tRNA^{Ser}(AGN)外，都能够形成典型的三叶草结构，其中tRNA^{Ser}(AGN)二级结构缺少了DHU臂，这一点与许多后生动物相一致。在其形成的二级结构中存在一些错配，非洲飞蝗、东方蝼蛄、疑钩额螽和中华稻蝗的错配数分别为17、5、37和29对，其中李氏大足蝗、东方蝼蛄、疑钩额螽和中华稻蝗的G-U错配（形成1个弱键）分别为16、24、24和16对。tRNA二级结构中的错配现象可以在RNA 编辑中得到校正，因而并不会影响各个tRNA基因的转运功能（Yokobori et al，1995）。

3.4　rRNA基因的二级结构比较

在已经预测出rRNA基因二级结构的昆虫中，选择同为直翅目的疑钩额螽与本研究中的李氏大足蝗rRNA基因二级结构进行比较（图4—7）。

疑钩额螽与李氏大足蝗srRNA基因都具有3个结构域，第Ⅰ和第Ⅱ结构域为可变区域，第Ⅲ结构域为保守区。李氏大足蝗与疑钩额螽相比，存在3处局部结构变异。在第Ⅰ结构域中，5'末端李氏大足蝗形成2个茎环结构，而疑钩额螽只形成1个。同时，在第Ⅰ结构域中，疑钩额螽形成H5与H5'2个茎环结构，而在李氏大足蝗中，1个茎环结构缺失。在第Ⅲ结构域中, 疑钩额螽相对与李氏大足蝗多形成了1个茎环结构（图5）。

lrRNA具有6个结构域，第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅵ结构域为可变区域，第Ⅳ和Ⅴ结构域为保守区域。在第Ⅱ结构域中，疑钩额螽比李氏大足蝗多出1个茎环结构（图7）。

从以上比较中可以看出，rRNA的结构域并不是完全绝对化的保守或可变。在srRNA中，处于保守区域的第Ⅲ结构域在一些区域发生了变化，而处于可变区域的第Ⅱ结构域也有部分是保守的；同样lrRNA中处于保守区域的第Ⅳ结构域也有部分区域发生了一些变化，而可变区域的结构域也有部分趋于保守。或许我们可以把节肢动物甚至是直翅目的rRNA二级结构的保守区域和可变区域更加精细化。

3.5　AT 富含区域的比较

李氏大足蝗、非洲飞蝗、疑钩额螽和中华稻蝗AT富含区域的长度分别为712、875、70和562 bp，AT含量分别为83.7%、85.94%、71.4%和86.6%，相比较而言，蝗虫的AT含量要比螽斯和蝼蛄稍高一些，而螽斯在这6种中是最低的。这4物种全基因组序列分别为15 597、15 722、14 976和15 443 bp，可见AT富含区域的长度变化是影响整个基因组的长度变化的主要因素。

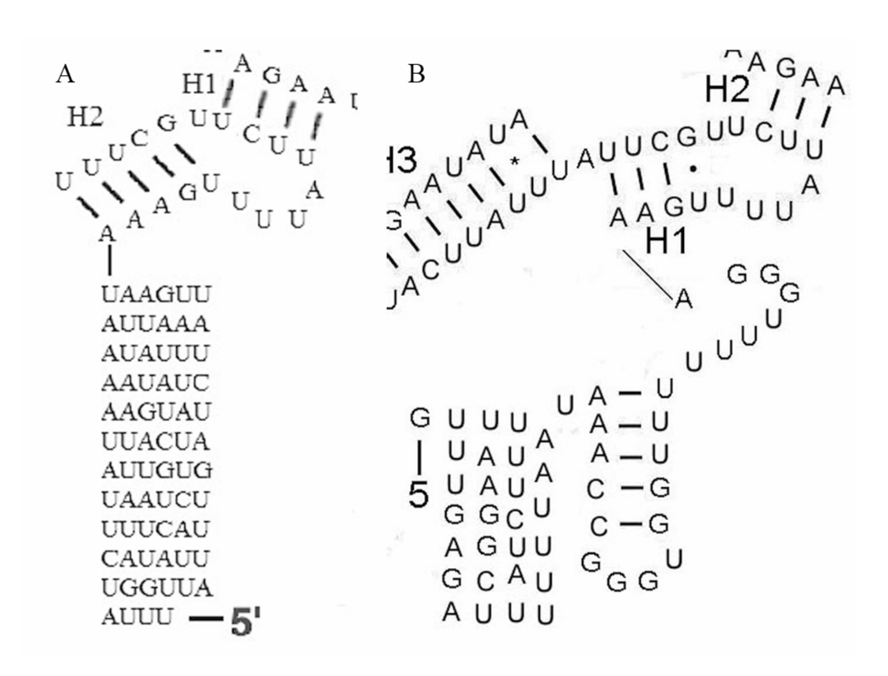


图 4 李氏大足蝗和疑钩额螽SrRNA 5'茎环结构(Ⅰ)

Fig. 4 Helices of srRNA 5' in *Aeropus licenti* Chang and *Ruspolia dubia*(I)

A: 疑钩额螽 *Ruspolia dubia*; B: 李氏大足蝗 *Aeropus licenti* Chang。

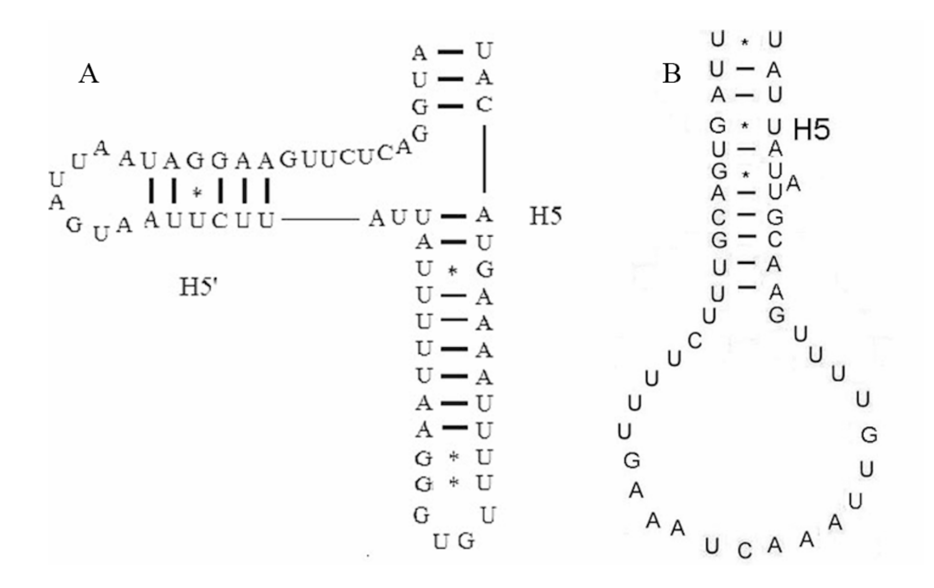


图 5 李氏大足蝗和疑钩额螽SrRNA茎环结构比对(Ⅰ)

Fig. 5 The comparison about helices of srRNA in *Aeropus licenti* Chang and *Ruspolia dubia*(I)

A: 疑钩额螽 *Ruspolia dubia*; B: 李氏大足蝗 *Aeropus licenti* Chang。

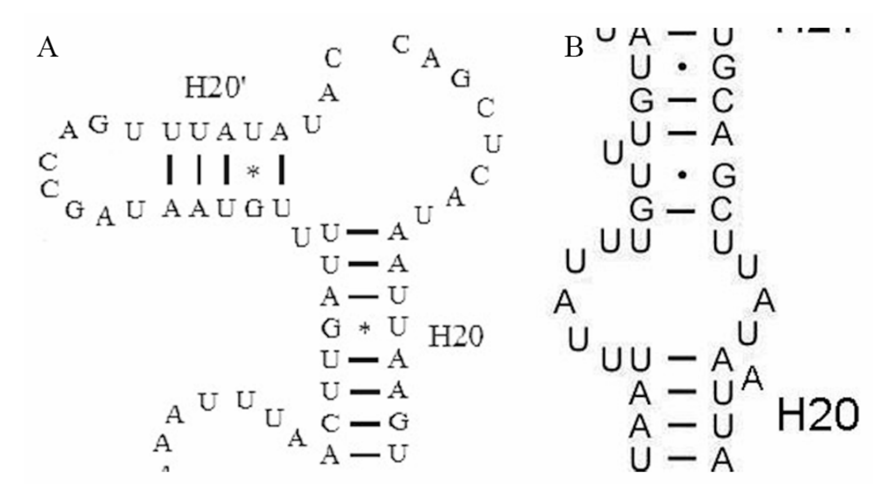


图 6 李氏大足蝗和疑钩额螽SrRNA茎环结构比对(III)

Fig. 6 The comparison about helices of SrRNA in *Aeropus licenti* Chang and *Ruspolia dubia*(III)

A: 疑钩额螽 *Ruspolia dubia*; B: 李氏大足蝗 *Aeropus licenti* Chang。

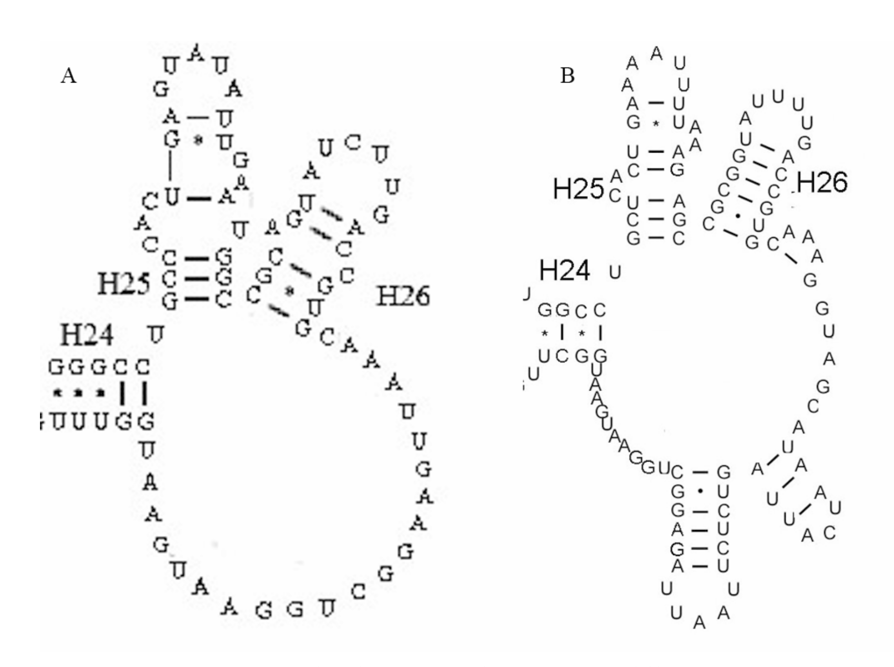


图 7 李氏大足蝗和疑钩额螽LrRNA茎环结构比对(Ⅱ)

Fig. 7 The comparison about helices of LrRNA in *Aeropus licenti* Chang and *Ruspolia dubia*(Ⅱ)

A: 疑钩额螽 *Ruspolia dubia*; B: 李氏大足蝗 *Aeropus licenti* Chang。

参考文献:

Ballard JWO. 2000. Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup [J]. *J Mol Evol*, **51**: 48-63.

Beard CB, Hamm DM, Collins FH. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*, DNA sequence, genome organization,and comparisons with mitochondrial sequences of other insects [J]. *Insect Mol Biol*, **2**(2): 103-124.

Bonfield JK, Smith KF, Staden R. 1995. A new DNA sequence assembly program [J]. *Nucl Acids Res*, **24**: 4992-4999.

Buckley TR, Simon C, Flookand PK, Misof B. 2000. Secondary structure and conserved motifs of the frequently sequenced domains IV and V of the insect mitochondrial large subunit rRNA gene [J]. *Insect Mol Biol*, **9** (6): 565-580.

Cameron SL, Miller K, D'Haese CA, Whiting MF, Barker SC. 2004. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea *sensulato* (Arthropoda)[J]. *Cladistics*, **20**: 534-557.

Cha SY, Yoon HJ, Lee EM, Yoon MH, Hwang JS, Jin BR, Han YS, Kim I. 2007. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignites*

(Hymenoptera: Apidae)[J]. *Gene*, **392**: 206-220.

Flook PK, Rowell CH, Gellissen G. 1995. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome [J]. *J Mol Evol,* **41**: 928-941.

Francino MP, Ochman H. 1997. Strand asymmetries in DNA evolution [J]. *Trends Genet*, **13**(6): 240-245.

Gillespie JJ, Johnston JS, Cannone JJ, Gutell RR. 2006. Characteristics of the nuclear (18*S*, 5.8*S*, 28*S* and 5*S*) and mitochondrial(12*S* and 16*S*)rRNA genes of *Apis mellifera*(Insect: Hymenoptera): Structure, organization, and retrotransposable elements [J]. *Insect Mol Biol*, **15**: 657-686.

Goddard JM, Wolstenholme DR. 1980. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from the genus Drosophila[J]. *NuclAcids Res*, **8**(4): 741-757.

Kim I, Cha SY, Yoon MH, Hwang JS, Lee SM, Sohn HD, Jin BR. 2005. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the oriental mole cricket, *Gryllotalpa orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae)[J]. *Gene*, **353**: 155-168.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Brief Bioinform*, **5**: 150-163.

Krzywinski J, Wilkerson NJ. 2003. Molecular systematics of *Anopheles*:from subgenera to subpopulations[J]. *Annu Rev Entomol*, **48**: 111-139.

Liu N, Hu J, Huang Y. 2006. Amplification of grasshoppers complete mitochondrial genomes using long PCR[J]. *Chn J Zool*, **41**: 61-65.

Lowe TM, Eddy SR. 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomeic sequence[J]. *Nucl Acids Res*, **25**: 955-964.

Yukuhiro K, Sezutsu H, Itoh M, Shimizu K, Banno Y. 2002. Significant levels of sequence divergence and gene rearrangements have occurred between the mitochondrial genomes of the wild mulberry silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*[J]. *Mol Biol Evol*, **19**: 1385-1389.

Lessinger AC, Martins Junqueira AC, Lemos TA, Kemper EL, da Silva FR, Vettore AL, Arruda P, Azeredo-Espin AM. 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)[J]. *Insect Mol Biol*, **9**(5):521-529.

Mitchell SE, Cockburn AF, Seawright JA. 1993. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species: A complete nucleotide sequence and gene organization[J]. Genome, **36**: 1058-1073.

Misof B, Fleck G. 2003. Comparative analysis of mt LSU rRNA secondary structures of Odonates: Structural variability and phylogenetic signal [J].*Insect Mol Biol*, **12** (6): 535-547.

Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F. 2003. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: Two haplotypes from distant geographical locations[J]. *Insect Mol Biol*, **12**: 605-611.

Reyes A, Gissi C, Pesole G, Saccone C. 1998. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals[J]. *Mol Biol Evol*, **15**(8): 957-966.

Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G, Reyes A. 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system[J].*Gene*, **238**(1): 195-209.

Saito S, Tamura K, Aotsuka T. 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects[J]. *Genetics*, **171**: 1695-1705.

Shadel GS, Clayton DA. 1993. Mitochondrial transcription initiation: Variation and conservation[J]. *J Biol Chem*, **268**: 16083-16086.

Shi HW, Ding FM, Huang Y. 2008. Complete mtDNA sequence of *Phlaeoba albonema* Zheng (Orthoptera，Acrididae) [J] *Chn J Biochem Mol Biol*, 24(7): 604-611.[师红雯，丁方美，黄 原. 2008. 白纹佛蝗全线粒体基因组研究. 中国生化与分子生物学报，**24**（7）**:** 604-611.]

Simon C, Frati F, Bekenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution,weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Ann Entomol Soc Am*, **87**: 651-701.

Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT. 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA [J]. *Ann Rev Ecol Evol Syst*, **37**: 545-579.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X window interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, **25**: 4876-4882.

Wilson K, Cahill V, Ballment E, Benzie J. 2000. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus mondon*: Are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? [J]. *J Mol Evol*, **17**: 863-874.

Wolstenholme DR. 1992. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution[J]. *Int Rev Cyt*, **141**: 173-216.

Yokobori S, Paabo S. 1995. Transfer RNA editing in land snail mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 10432-10435.

Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. 1995. Evolution and structure conservation of the contral region of insect mitochondrial DNA [J]. *J Mol Evol*, **40**: 382-391.

Zhang CY, Huang Y. 2008. Complete mitochondrial genome of *Oxya chinensis* (Orthoptera, Acridoidea)[J]. *Acta Biochim Biophy Sin*, **40**(1): 7-18.

Zhou ZJ, Huang Y, Shi FM. 2007. The mitochondrial genome of the *Ruspolia dubia* (Orthoptera: Conocephalidae): A short A+T-rich region with 70bp in length [J]. *Genome*, **50**(9): 855-866.